

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-217760

(43)公開日 平成6年(1994)8月9日

(51)Int.Cl.⁵

C 1 2 N 1/20

識別記号

庁内整理番号

A 7236-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平4-305681

(22)出願日 平成4年(1992)11月16日

(71)出願人 592236496

佐竹 幸子

群馬県前橋市古市町1-33-20 メゾン立
木108

(72)発明者 佐竹 幸子

群馬県前橋市古市町1-33-20 メゾン立
木108

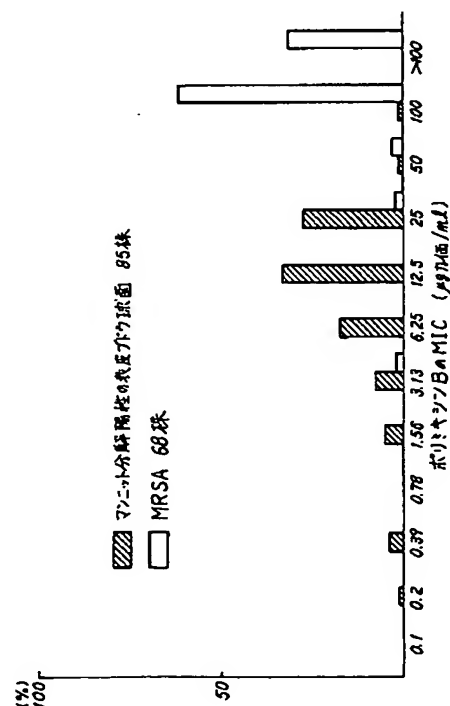
(74)代理人 弁理士 杉村 暁秀 (外5名)

(54)【発明の名称】 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の選択および鑑別分離培地

(57)【要約】

【目的】 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を選択的に分離し鑑別するための培地。

【構成】 枯草菌、緑膿菌およびメチシリン耐性表皮ブドウ球菌の発育を阻止するがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の発育を許容する第一の抗生物質と、酵母の発育を阻止するがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の発育を許容する第二の抗生物質と、枯草菌およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌の発育を阻止するがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の発育を許容する第三の抗生物質とを、適宜に定める関係力価濃度を以て配合してなる、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のみを選択的に発育させるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の選択および鑑別分離培地。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 枯草菌、緑膿菌およびメチシリン耐性表皮ブドウ球菌に対する発育阻止濃度範囲とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する発育支持濃度範囲とが互いに重複する第一の抗生物質と、酵母に対する発育阻止濃度範囲とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する発育支持濃度範囲とが互いに重複する第二の抗生物質と、枯草菌およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌に対する発育阻止濃度範囲とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の発育支持濃度範囲とが互いに重複する第三の抗生物質とを、酵母、枯草菌、緑膿菌、メチシリン耐性表皮ブドウ球菌およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌の発育を実質的に阻止するが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の発育を支持するような関係力価濃度を以て含有してなるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の選択および鑑別分離培地。

【請求項2】 前記第一の抗生物質がポリミキシンA、B、C、D、EおよびMよりなる群から選ばれた少なくとも1種のポリペプチド系抗生物質であり、前記第二の抗生物質がアンホテリシンB、ナイスチン、ピマリシン、トリコマイシン、グリセオフルビン、ペンタマイシン、カンディシジン、ハマイシンおよびクロミンよりなる群から選ばれた少なくとも1種のポリエン系抗生物質であり、また前記第三の抗生物質がオキサシリン、メチシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリンおよびナフシリンよりなる群から選ばれた少なくとも1種のβ-ラクタム系抗生物質である請求項1記載の培地。

【請求項3】 前記ポリペプチド系抗生物質がポリミキシンBまたはEであり、前記ポリエン系抗生物質がアンホテリシンBであり、また前記β-ラクタム系抗生物質がオキサシリンである請求項2記載の培地。

【請求項4】 前記ポリミキシンBまたはE、アンホテリシンBおよびオキサシリンがそれぞれ10-1000mg力価/l、0.01-10mg力価/lおよび0.01-1.0mg力価/lの力価濃度を以て含有される請求項3記載の培地。

【請求項5】 更に少なくとも10g/lのマンニットおよび1-0.005g/lのフェノールレッドを含有する請求項1、2、3または4記載の培地。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は多剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, 以下、「MRSA」と略記する) を選択的に分離し更に識別するための分離培地に関する。本発明培地はMRSA感染症の治療、予防等の医療並びに環境衛生の改善・維持に利用される。

【0002】

【従来の技術】 ペニシリンはサルファ剤等の化学療法剤が効かない黄色ブドウ球菌に対して優れた治療効果を示していたが、ペニシリンの普及に伴って、ペニシリンが

効かないペニシリン耐性黄色ブドウ球菌が増加した。1960年にペニシリン耐性黄色ブドウ球菌に効くメチシリンが開発されたが、使用開始まもなくMRSAが発見された。その後も、黄色ブドウ球菌は新たに開発された種類の異なる薬剤に対しても次々と耐性を獲得し、多剤耐性菌となって行った。1980年代に入って、我国においてもMRSAによる病院内感染が報告されるようになり (Chemotherapy 31:835-841, 1983)、その後急激に日本全国の病院に拡散し、現在では老人ホーム等にも蔓延している。多剤耐性MRSA感染症の治療は困難な場合が多く、死に至る場合もあり、社会問題として取り上げられるようになって来た。

【0003】 従来、MRSAの確認は次のような手順を経て行われていた。即ち、まず検査材料を分離培地に塗布し、35℃で18-24時間培養すると、菌は肉眼で観察可能な集落を形成する。種々な形態を示す集落のうち黄色ブドウ球菌と思われるものについて、黄色ブドウ球菌であることを確認するための同定検査、即ちグラム染色、コアグラゼ試験、マンニット分解能試験等の検査と、メチシリン耐性であることを確認するための感受性検査とを実施する。これらの検査のために集落を鉗菌して数種類の培地に接種し、更に35℃で18-24時間培養した上、培地所見を観察してMRSAであることを確認する。従って、検査材料が提出されてからMRSAの存在が確認される迄に少なくとも42-48時間が必要であった。

【0004】 メチシリン耐性の確認検査に使用される培地として、オキサシリン (oxacillin) を添加したMRSAスクリーン培地 (J. Clin. Microbiol. 18: 1084-1091, 1983) およびセフトゾキシム (ceftizoxime) を添加したMS培地 (臨床と微生物19: 122, 1992) が提案されている。しかしながら、上記MRSAスクリーン培地はメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, 以下、「MSA」と略記する) と枯草菌の一部に発育阻止効果が見られるが、酵母、緑膿菌、腸球菌およびメチシリン耐性表皮ブドウ球菌 (methicillin resistant coagulase negative *Staphylococci*, 以下、「MRCNS」と略記する) の発育を阻止できず、更に成育したMRSAの集落が小さ過ぎて肉眼判定に困難を来すという難点がある。一方、MS培地はMSAの発育を阻止するが、酵母、枯草菌、緑膿菌、腸球菌およびMRCNSの発育を阻止できず、更に成育したMRSA菌数が24時間培養後に著しく減少する場合があるという問題点がある。このように、種々の菌が混在する臨床および環境材料からMRSAを選択的に分離培養することを目的とした場合、これら既存の培地は選択性および鑑別性が十分ではない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、MRSAに対し特異的选择性に優れ且つ鑑別の容易

な分離培地を提供することを第1の目的とする。第2の目的は、MRSA検出のための試験を簡略化し且つそれに要する時間を短縮することによって、検査経費並びに人件費を大幅に削減するにある。終局の目的はMRSA感染症の治療並びに環境汚染対策を迅速且つ遺漏無く実施せんとするにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記の目的は、枯草菌、緑膿菌およびMRCNSに対する発育阻止濃度範囲とMRSAに対する発育支持濃度範囲とが互いに重複する第一の抗生物質と、酵母に対する発育阻止濃度範囲とMRSAに対する発育支持濃度範囲とが互いに重複する第二の抗生物質と、枯草菌およびMSSAに対する発育阻止濃度範囲とMRSAの発育支持濃度範囲とが互いに重複する第三の抗生物質とを、酵母、枯草菌、緑膿菌、MRCNSおよびMSSAの発育を実質的に阻止するが、MRSAの発育を支持するような関係力価濃度を以て含有してなるMRSAの選択および鑑別分離培地（以下、「MRSA選択培地」という）によって達成される。

【0007】前記第一の抗生物質は好ましくはポリミキシンA、B、C、D、EおよびMよりなる群から選ばれた少なくとも1種のポリペプチド系抗生物質であり、前記第二の抗生物質は好ましくはアンホテリシンB、ナイスタチン、ピマリシン、トリコマイシン、グリセオフルビン、ペンタマイシン、カンディシジン、ハマイシンおよびクロミンよりなる群から選ばれた少なくとも1種のポリエン系抗生物質であり、また前記第三の抗生物質は好ましくはオキサシリン、メチシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリンおよびナフシリンよりなる群から選ばれた少なくとも1種のβ-ラクタム系抗生物質である。

【0008】前記ポリペプチド系抗生物質としては特にポリミキシンBまたはEが好ましく、前記ポリエン系抗生物質としては特にアンホテリシンBが好ましく、また前記β-ラクタム系抗生物質としては特にオキサシリンが好ましい。

【0009】前記ポリミキシンBまたはE、アンホテリシンBおよびオキサシリンは、それぞれ10-1000mg力価/l、0.01-10mg力価/lおよび0.01-1.0mg力価/lの範囲内の力価濃度を以て含有されることが本発明の目的を達成する上で特に好ましい。最も好ましい関係力価濃度は、ポリミキシンBまたはEが約100mg力価/l、アンホテリシンBが約1.0mg力価/lおよびオキサシリンが約0.1mg力価/lである。

【0010】本発明にかかる培地は、好適には、更に少なくとも10g/lのマンニットおよび1-0.005g/lのフェノールレッドを含有する。

【0011】以下、本発明の構成を詳述する。種々の菌が混在する臨床および環境材料からMRSAを選択的に分離培養することを目的とした場合、MRSAと同時に

分離される頻度の高い菌として、臨床材料についてはグラム陰性桿菌を代表する緑膿菌；真菌類を代表する酵母；腸球菌などがあり、環境材料からは同様に酵母、ケカビなどの真菌や枯草菌などがあり、更にMSSAおよびMRCNSが挙げられる。これら代表的な菌の発育を阻止できれば、それとグラム染色性などの分類学的、または遺伝学的、生態学的特徴において近縁関係にある菌種を含んで、被検試料からの菌は実質的に全て阻止されたものと見なすことができる。従って、本発明のMRSA選択培地は、MRSAの発育を支持するが、同時に上記の高い頻度で混入する菌類の発育を実質的に阻止または抑制するために、MRSAに対する耐性を維持しながら、上記各種の代表的菌種を基準として、それらの感受性を高めるように特定の抗生物質を複数組み合わせる含有する。

【0012】本書中において、「発育を実質的に阻止する」とは、その毒性によって完全に発育を阻止しまたは破壊することの他に、明らかに菌数の減少が認められるが測定限界近くで僅かな発育が認められる場合を許容範囲として含み、本発明の目的達成に支障を来さない程度に菌の発育を阻止することを意味するものとする。

【0013】本発明においては、培地および配合される抗生物質に対する菌の耐性並びに感受性の目安としては、日本化学療法学会標準法に従った寒天希釈法による最小発育阻止濃度（以下、「MIC」という）を適用する。或る菌に対するMICの値が比較的小さいものは菌の感受性が高く、反対にMICの値が比較的大きいものは耐性が強いとされる。

【0014】本発明選択培地に配合される第一の抗生物質としては、ポリミキシン（polymyxin）群に属するポリペプチド系抗生物質があり、例えば、ポリミキシンA、ポリミキシンB、ポリミキシンC、ポリミキシンD、ポリミキシンE（コリスチン-colistin）およびポリミキシンMが挙げられ、中でもポリミキシンBおよびポリミキシンE（コリスチン）が特に有利に適用される。これらは単独でもしくは活性の拮抗阻害を極度に生じない限り複数を組み合わせて配合することができる。

【0015】上記第一の抗生物質に対して、枯草菌、緑膿菌およびMRCNSは高い感受性を示すが、MRSAは強い耐性を示す。例えば、ポリミキシンBおよびコリスチンの場合で、枯草菌に対して約25mg力価/l以下、緑膿菌に対して約0.78mg力価/l以下、またMRCNSに対しては約25mg力価/lという比較的低いMICを示す一方、MRSAに対するMICは約50mg/lと高い。このことは、枯草菌、緑膿菌およびMRCNSのすべての発育を阻止する濃度範囲すなわち、少なくとも約25mg力価/lの「発育阻止濃度範囲」と、MRSAの発育を支持する濃度範囲、すなわち高々約50mg力価/lの「発育支持濃度範囲」とが約25mg力価/lと約50mg力価/lとの間で重複していることを表す。従って、理論的にはこの抗生物質単

独で、約25mg力価/lと約50mg力価/lとの間の濃度において、枯草菌、緑膿菌およびMRCSのすべての発育を阻止すると同時に、MRSAの発育を許容することとなる。また、緑膿菌のみを対象とするならば、約0.78mg力価/lの濃度でMRSAの発育を支持しながら緑膿菌の発育を阻止し得ることとなる。

【0016】本発明に適用可能な第二の抗生物質としては、例えば、アンホテリシンB (amphotericin B)、ナイスタチン (nystatin)、ピマリシン (pimaricin)、トリコマイシン (trichomycin)、グリセオフルビン (griseofulvin)、ペンタマイシン (pentamycin)、カンディシジン (candididine)、ハマイシン (hamycin)、クロミンなどのポリエン系抗生物質；ミコナゾール (miconazole)、ケトコナゾール (ketoconazole)、エコナゾール (econazole)、クロトリマゾール (clotrimazole)、フルコナゾール (fluconazole) などのアゾール系抗生物質；アクチジオン (actidione) などグルタルイミド系抗生物質；およびフルシトシン (flucytosine) 5-FC、ピロールニトリン (pyrrolnitrin)、シッカニン (siccanin) およびサラマイセチン (saramycin) などが挙げられる。これらのうち、ポリエン系抗生物質が特に好ましく、最も好ましくは、アンホテリシンBである。これらは単独でもしくは活性の拮抗阻害を極度に生じない限り複数を組み合わせて配合することができる。

【0017】上記第二の抗生物質は、酵母に対する発育阻止濃度範囲とMRSAに対する発育支持濃度範囲とが互いに大きく重複する。例えば、最も代表的なアンホテリシンBについてみると、酵母に対して高々約 0.1mg力価/lという著しく低いMICを示す一方、MRSAに対するMICは約 100mg力価/l超と高い値を示す。このことは、酵母の発育を阻止する濃度範囲すなわち、約 0.1mg力価/l以上の「発育阻止濃度範囲」と、MRSAの発育を支持する濃度範囲、すなわち 100mg力価/l以下の「発育支持濃度範囲」とが約 0.1mg力価/lと約 100mg力価/l (以上) との間で重複していることを表す。従って、理論的にはこの抗生物質単独で、約 0.1mg力価/lと約 100mg力価/lとの間の濃度において、酵母の発育を完全に阻止すると同時に、MRSAの発育を許容することとなる。

【0018】本発明に適用可能な第三の抗生物質としては、β-ラクタム系、例えば、オキサシリン、メチシリン、クロキサシリン (cloxacillin)、ジクロキサシリン (dicloxacillin)、フルクロキサシリン (flucloxacillin)、ナフシリン (nafcillin)、などのペニシリン系抗生物質；セファロリジン (cephaloridine)、セファロチン (cephalothin)、セファゾリン (cefazolin)、セファピリン (cephapirin)、セファセトリル (cephacetrile)、セフテゾール (ceftezole)、セファログリシン (cephaloglycin)、セファレキシン (ce-

phalexin)、セフラジン (cefradine)、セファトリジン (cefatrizine)、セファクロール (cefactor)、セフロキサジン (cefroxadine)、セファドロキシル (cefadroxil)、セフプロジル (cefprozil)、セファマンドール (cefamandole)、セフォチアム (cefotam)、セフロキシム (cefuroxime)、セフロキシムアクセチル (cefuroxime axetil)、セフォチアムヘキサチル (cefotiam hexetil)、セフォペラゾン (cefoperazone)、セフォタキシム (cefotaxime)、セフチゾキシム (ceftizoxime)、セフメノキシム (cefmenoxime)、セフピラマイド (cefpiramide)、セフトジタイム (ceftazidime)、セフトリアキソン (ceftriaxone)、セフピミゾール (cefpimizole)、セフゾナム (cefuzonam)、セフォディジム (cefodizime)、セフピローム (cefpirome)、セフェピム (cefepime)、セフクリジン (cefclidin)、セフスロジン (cefsulodin)、セフィキシム (cefixime)、セフチブテン (ceftibuten)、セフジニール (cefdinir)、セフボドキシムプロキセチル (cefpodoxime proxetil)、セフテラムビボキシル (cefteram pivoxil)、セフェタメトビボキシル (cefetamet pivoxil)、セフカメートビボキシル (cefcamate pivoxil)、ME-207、などのセフェム系抗生物質；セフォキシチン (cefoxitin)、セフメタゾール (cefmetaole)、セフォテタン (cefotetan)、セフブペラゾン (cefbuperazone)、セフミノクス (cefminox)、などのセファマイシン系抗生物質；ラタモキシセフ (latamoxef)、フロモキシセフ (flomoxef)、などのオキサセフェム系抗生物質；およびイミペネム (imipenem)、パニペネム (panipenem)、メロペネム (meropenem)、などのカルバペネム系抗生物質を挙げることができ、これらのうち、ペニシリン系が好ましく、中でもオキサシリンが最も好ましい。これらは単独で若しくは活性の拮抗阻害を極度に生じない限り複数を組み合わせて配合することができる。

【0019】上記第三の抗生物質は、枯草菌およびMRSAに対する発育阻止濃度範囲とMRSAに対する発育支持濃度範囲とが互いに大きく重複する。例えば、最も代表的なオキサシリンについてみると、枯草菌に対して約0.78mg力価/l以下、MRSAに対して約 0.4mg力価/l以下という著しく低いMICを示す一方、MRSAに対するMICは約 100mg力価/l以上と高い値を示す。このことは、枯草菌とMRSAとの発育を共に阻止する濃度範囲すなわち、約0.78mg力価/l以上の「発育阻止濃度範囲」と、MRSAの発育を支持する濃度範囲、すなわち 100mg力価/l以下の「発育支持濃度範囲」とが約0.78mg力価/lと約 100mg力価/l (以上) との間で重複していることを表す。従って、理論的にはこの抗生物質単独で、約0.78mg力価/lと約 100mg力価/lとの間の濃度において、枯草菌およびMRSAの発育を完全に阻止すると同時に、MRSAの発育を許容することとなる。

【0020】本発明に適用される抗生物質は、微生物代謝物質、合成物質、半合成物質のいずれでも良い。これらの抗生物質の各菌種に対するMICの値は、微生物の生体活性を対象とするものであるから類縁抗生物質群、例えば上記第一の群に属するものの菌株間でも当然変化する上に、各抗生物質相互間の活性の相乗作用あるいは拮抗阻害作用などにより、これら三種の抗生物質の適正配合量を一義的に定めることはできない。従って、それらの配合量は、各抗生物質の代表的な菌に対するMICを基準として、配合された培地が、酵母、枯草菌、緑膿菌、MRCNSおよびMSSAの発育を実質的に阻止するが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の発育を支持するような関係力価濃度を実験的に適宜決定する。

【0021】例えば、前記ポリペプチド系抗生物質がポリミキシンBまたはEであり、前記ポリエン系抗生物質がアンホテリシンBであり、また前記β-ラクタム系抗生物質がオキサシリンである本発明の最も好ましい態様においては、活性の相乗作用および拮抗阻害作用を考慮に入れて、それぞれ約10ー約1000mg力価/l、約0.01ー約10mg力価/lおよび約0.01ー約1.0mg 力価/lの力価濃度を以て配合すれば良好な結果を齎すことが実験的に確認された。

【0022】上記抗生物質は、通常慣用されている、寒天やゼラチンなどを含む固形培地中に配合する。培地は天然培地、半合成培地及び合成培地のいずれも適用可能であり、一般に、Na, K, Ca, Mg, P, Clなどの基本的無機成分に加えて、炭素源、チッソ源、アミノ酸、ビタミン、ホルモンなどを適宜に加えたものを基本成分とし、pHを約7.4に調節する。本発明のMRSA選択培地は、本培地に発育してきた他の菌とMRSAとを鑑別するために、更に少なくとも10g/lのマンニットおよび1ー0.005g/lのフェノールレッド(pH指示薬)を含有することが好ましい。その他のpH指示薬も使用可能であるが、例えばブロムチモールブルー(BTB)はブドウ球菌の発育を阻止して、培地の作用に影響する恐れがあるから避けるべきである。また、培地の調製は無菌条件下に行うべきことはいうまでもない。

【0023】

【作用】次いで、本発明MRSA選択培地の作用について述べる。上記の構成になる本発明MRSA選択培地を被検環境に暴露するか、または臨床あるいは環境からの被検材料を培地に塗布し、約30ー35℃で18ー24時間静置培養する。本発明培地は酵母、枯草菌、緑膿菌、MSSA及びMRCNSを以て代表される雑菌の発育を実質的に阻害し、MRSAを選択的に発育させて周辺が黄色に着色した特徴的な集落を形成する。この着色はマンニットとフェノールレッドの添加によるものである。すなわち、マンニット分解能陽性であるMRSAのマンニット分解作用により生成する酸性物質のためフェノールレッドが黄色しMRSAの識別を容易にする。

【0024】この際マンニット分解能陽性の腸球菌や、例外的に僅かな枯草菌が発育することがある。しかしながらこれらの菌の集落はMRSAの集落とは異なる形態を示すので、培地上での鑑別は容易である。また、約3%濃度の過酸化水素を吸蔵するガラスキャピラリーを以て集落を軽く刺突すれば、MRSAの場合にはその含有するカタラーゼの作用により過酸化水素が分解発泡するため、それを観察することにより、腸球菌などと容易に識別することもできる。

【0025】

【実施例】以下、本発明を更に実施例により、また図面を参照して、説明する。

実施例1

使用菌株

臨床および環境材料から分離された酵母、枯草菌、緑膿菌、MSSAおよびMRCNSをそれぞれ4株、腸球菌を3株、MRSAを68株、マンニット分解能陽性でコアグララーゼ陰性のブドウ球菌を85株用意した。

【0026】使用抗生物質

セフチゾキシムは藤沢工業株式会社、オキサシリンおよびコリスチンは萬有製薬株式会社、ポリミキシンBは富士製薬工業株式会社より力価検定済み粉末の提供を受けた。アンホテリシンBは注射用アンホテリシンBを購入し、1バイアル中の内容物を秤量し、1mg当たりの力価を求めて使用した。

【0027】〔培地の調製〕抗生物質以外の寒天やペプトン等を秤量して精製水に溶かし、121℃で20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後50ー60℃に保った培地に抗生物質を添加し、ペトリ皿に20mlずつ分注して固形培地とした。

【0028】〔同定試験および薬剤感受性試験〕初代分離培養で得られた集落を普通寒天培地に純培養し、純培養で得られた集落から同定試験および薬剤感受性試験を実施した。マンニット分解能陽性、グラム染色陽性の球菌、カタラーゼ陽性、コアグララーゼ陽性の性質を示す菌を黄色ブドウ球菌とした。薬剤感受性試験は日本化学療法学会標準法に従った寒天希釈法でMICを測定した。セフチゾキシムおよびオキサシリンのMICがそれぞれ $\geq 100 \mu\text{g}$ 力価/ml、 $\geq 6.25 \mu\text{g}$ 力価/mlの黄色ブドウ球菌をMRSAとした。

【0029】〔Miles & Misra 法による培地の選択性および発育支持性試験〕各菌株を普通ブイヨンで35℃、18時間培養し、これらの菌液を滅菌生理食塩水で10倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍、希釈し、それぞれの希釈菌液の5 μl ずつを抗生物質を含有する培地と抗生物質を含有しない同一平板培地にそれぞれ接種し、コンラージ棒で塗り広げた。35℃で24時間培養した後、発育した集落数をカウントし、次の式から発育百分率を求めた。

【数1】

$$\text{発育百分率 (\%)} = \frac{\text{抗生物質を含む培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質を含まない培地で発育した集落数}} \times 100$$

また、培地の発育支持性を観察するために独立集落の直径を顕微鏡下でマイクロメーターを使用して測定した。

【0030】【臨床および環境材料より分離される菌種の各種抗生物質に対するMIC】種々の菌が混在する臨床および環境材料からMRSAと同時に分離される頻度の高い菌である酵母、ケカビなどの真菌、枯草菌、緑膿

菌、腸球菌などの発育を阻止するために、まずこれらの菌に対するMICを測定した。その結果を表1に示した。

【0031】

【表1】

臨床および環境材料より分離される菌種に対する各種抗生物質のMIC

菌名	菌株番号	MIC (μg 力価/ml)				
		MPIPC	PL-B	CL	AMPH-B	CZX
酵母	36	>100	25	25	≤0.1	>100
	37	>100	25	100	≤0.1	>100
	70	>100	25	25	≤0.1	>100
	80	>100	12.5	6.25	≤0.1	>100
枯草菌	92	0.39	25	25	>100	>100
	46	0.78	12.5	25	>100	>100
	53	0.78	12.5	25	>100	>100
	67	6.25	0.78	1.56	>100	>100
緑膿菌	102	>100	0.78	0.78	>100	25
	103	>100	0.78	0.78	>100	12.5
	105	>100	0.78	0.78	>100	>100
	106	>100	0.39	0.78	>100	100
	107	>100	0.78	0.78	>100	50
腸球菌	108	12.5	>100	>100	>100	>100
	109	>100	50	100	>100	>100
	110	12.5	50	100	100	>100
MRCNS	31	6.25	6.25	12.5	>100	>100
	38	12.5	6.25	12.5	>100	>100
	26	>100	12.5	25	>100	>100
MSSA	3	0.2	100	ND	ND	0.78
	9	0.2	50	ND	ND	3.13
	18	0.39	50	ND	ND	6.25
	20	0.2	100	ND	ND	3.13
MRSA	27	>100	50	100	>100	>100
	28	>100	50	100	>100	>100
	29	>100	50	>100	>100	>100

注)

MPIPC : オキサシリン
 PL-B : ポリミキシンB
 CL : コリスチン
 AMPH-B : アンホテリシンB
 CZX : セフトゾキシム

【0032】表1から明らかな通り、アンホテリシンBに対して酵母4株は≤0.1 μg 力価/ml の高い感受性を示したのに対し、細菌は>100 μg 力価/ml の耐性を示した。ポリミキシンBに対しては緑膿菌5株が 0.39 - 0.78 μg 力価/ml のMICを示し、これらの抗生物質で酵母、枯草菌および緑膿菌の発育阻止ができることが確認された。

【0033】比較例1

【セフトゾキシム濃度の検討】セフトゾキシムはメチシリンと同じβ-ラクタム系の抗生物質であり、MRSAはメチシリンの他に化学構造が類似しているβ-ラクタム系抗生物質にも交差耐性を示すことが知られており（臨床病理、39：548-556、1991）、MS培地ではMRSAの選択にセフトゾキシムを添加している。MRS

Aの中には遺伝学的に同一であるにもかかわらず、細胞集団の中には耐性の発現が異なる細胞があることが知られており、このような菌株をヘテロ耐性と呼んでいる。そこで、アンホテリシンBを1 μ g 力価/mlとポリミキシンBを25 μ g 力価/ml添加した培地にセフトゾキシムを3.13, 6.25, 12.5, 25 μ g/ml添加し、ヘテロ耐性の

菌株を用いてMSSAとMRSAとを区分できるセフトゾキシム濃度の検討を行った。その結果を表2に示した。

【0034】

【表2】

セフトゾキシム濃度の検討

菌	菌株番号	1 発 育 百 分 率 (%)						
		MH 培地 + 4 % NaCl への抗生物質配合量 (μ g 力価/ml)	基礎培地 + AMPH-B + PL-B + (1 μ g 力価/ml) (25 μ g 力価/ml)					
			CZX 配合量 (μ g 力価/ml)					
			CZX : 25	MPIPC : 6	0	3.13	6.25	12.5
MRSA	5	138	88	94	76	71	49	20
	27	140	100	79	58	63	68	53
	87	58	29	100	<0.083	<0.083	0.25	0.75
	98	0.042	3.2	140	<0.23	<0.23	<0.23	<0.23
MSSA	3	ND	ND	117	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17
	9	ND	ND	48	<0.21	<0.21	<0.21	<0.21
	19	ND	ND	121	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14
	20	ND	ND	107	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14

注)

MH培地: Mueller Hinton培地

MPIPC: オキサシリン

PL-B: ポリミキシンB

AMPH-B: アンホテリシンB

CZX: セフトゾキシム

$$\text{発育百分率 (\%)} = \frac{\text{抗生物質含有培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質不含培地で発育した集落数}} \times 100$$

【0035】表2から明らかな通り、MRSAの菌株番号87の株はセフトゾキシムを3.13-6.25 μ g 力価/ml添加したいずれの培地においても発育が認められなかったが、それより濃度の高い12.5 μ g 力価/mlと25 μ g 力価/ml添加培地において発育が認められた。これはセフトゾキシムでよく観察されるスキップ現象である。従って、このような菌株の検出を目的としてセフトゾキシムを培地に添加することは適切でないことが判明した。

【0036】実施例2

【オキサシリンの安定性の検討】セフトゾキシムを25 μ g 力価/mlあるいはオキサシリンを6 μ g 力価/ml含む培地にアンホテリシンBを1 μ g 力価/mlとポリミキシンBを25 μ g 力価/ml添加すると、相乗効果によりMRSAの発育抑制が観察された。その結果を表3に示した。

【0037】

【表3】

各種抗生物質がMRSAの発育に及ぼす影響

基礎培地への抗生物質配合量 (μg 力価/ml)	発育百分率 (%)	
	MRSA 87	MRSA 98
CZX : 25	1.6	0.013
CZX : 25 + AMPH-B : 1	1.3	<0.00022
CZX : 25 + PL-B : 25	0.083	<0.00022
CZX : 25 + AMPH-B : 1 + PL-B : 25	0.0017	<0.00022
MPIPC : 6	13	1.1
MPIPC : 6 + AMPH-B : 1	22	0.80
MPIPC : 6 + PL-B : 25	70	0.40
MPIPC : 6 + AMPH-B : 1 + PL-B : 25	5.7	0.11

注)

MPIPC : オキサシリン
PL-B : ポリミキシンB
AMPH-B : アンホテリシンB
CZX : セフチゾキシム

$$\text{発育百分率 (\%)} = \frac{\text{抗生物質含有培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質不含培地で発育した集落数}} \times 100$$

【0038】表3より明らかな通り、前記の相乗効果はオキサシリンが、セフチゾキシムの約1000分の1のオーダーであった。このようにオキサシリンの高い安定性が確認された。

【0039】実施例3

〔ポリミキシンBおよびオキサシリンの濃度の検討〕アンホテリシンBを1 μg 力価/ml含有する培地にポリミキシンBを25, 50, 100, 200, 400 μg 力価/ml添加した培地を調製し、枯草菌、MRSA、MRCNSの発育を観察した。その結果、ポリミキシンBを100 μg 力

価/ml添加した培地において枯草菌とMRCNSの発育が抑制されたが、MRSAの発育には影響は見られなかった。

【0040】そこで、アンホテリシンBを1 μg 力価/mlとポリミキシンBを100 μg 力価/ml含有する培地にオキサシリンを0.1, 0.2, 0.39, 0.78 μg 力価/ml添加した培地を調製し、枯草菌、MSSA、MRSA発育を観察した。その結果を表4に示した。

【0041】

【表4】

オキサシリン濃度の検討

菌	菌株番号	発育百分率 (%)				
		AMPH-B (1 μg 力価/ml) + PL-B (100 μg 力価/ml) +				
		MPIPCの配合量 (μg 力価/ml)				
		0	0.1	0.2	0.39	0.78
枯草菌	46	<0.0017	<0.0017	<0.0017	<0.0017	<0.0017
MSSA	3	97	<0.00026	<0.00026	<0.00026	<0.00026
MRSA	87	97	130	120	140	7.1
	98	150	130	25	1.5	<0.0005

注)

MPIPC : オキサシリン
PL-B : ポリミキシンB
AMPH-B : アンホテリシンB
CZX : セフチゾキシム

$$\text{発育百分率 (\%)} = \frac{\text{抗生物質含有培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質不含培地で発育した集落数}} \times 100$$

【0042】表4から明らかな通り、オキサシリンを0.2 μg 力価/ml以上添加した培地においてMRSA菌株番号98の発育抑制が観察された。しかし、オキサシリン

を0.1 μg 力価/ml添加した培地においてはMRSAの発育抑制は観察されず、MSSAと枯草菌の発育は阻止されていた。

【0043】以上の結果から、MRSA選択培地の組成の好適な一例を次のように定めた。酵母様真菌やケカビ類の発育を阻止するために抗真菌剤であるアンホテリシンBを1 μ g 力価/ml、緑膿菌を始めとするグラム陰性菌性桿菌および表皮ブドウ球菌の発育を阻止するためにポリミキシンBを100 μ g 力価/ml、MSSAを阻止するためにオキサシリンを0.1 μ g 力価/ml添加する。また、本発明培地に発育してきた他の菌とMRSAとの鑑別を容易にするためにマンニットとフェノールレッドとを添加する。

【0044】実施例4

[各抗生物質の関係濃度の検討] アンホテリシンBを1 μ g 力価/mlおよびポリミキシンBを100 μ g 力価/ml

含有する培地にオキサシリンを0.10, 0.1, 1.0, 10または100 μ g 力価/ml配合した5種類の培地；ポリミキシンBを100 μ g 力価/mlおよびオキサシリンを0.1 μ g 力価/ml含有する培地にアンホテリシンBを0.10, 0.1, 1.0, 10または100 μ g 力価/ml配合した5種類の培地；およびアンホテリシンBを1 μ g 力価/mlおよびオキサシリンを0.1 μ g 力価/ml含有する培地にポリミキシンBを0.1, 1.0, 10, 100または1000 μ g 力価/ml配合した5種類の培地を調製し、緑膿菌、MSSA、MRCNS、MRSAのこれら培地上における24時間培養後の発育を観察した。その結果を表5に示した。

【0045】

【表5】

抗生物質の関係濃度の検討

菌	菌株番号	発育百分率(%)				
		AMPH-B(1 μ g 力価/ml)+PL-B(100 μ g 力価/ml)+MPIPCの配合量(μ g 力価/ml)				
		0.01	0.1	1.0	10	100
MSSA	3	140	<0.26	<0.26	<0.26	<0.26
MRSA	27	53	92	81	19	<0.28
MRSA	98	150	120	<0.13	<0.13	<0.13
MRSA	27	PL-B(100 μ g 力価/ml)+MPIPC(0.1 μ g 力価/ml)+AMPH-Bの配合量(μ g 力価/ml)				
		0.01	0.1	1.0	10	100
MRSA	27	89	78	53	92	<0.28
MRSA	98	110	100	100	<0.14	<0.14
緑膿菌	102	AMPH-B(1 μ g 力価/ml)+MPIPC(0.1 μ g 力価/ml)+PL-Bの配合量(μ g 力価/ml)				
		0.01	0.1	1.0	10	100
MRCNS	35	121	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14
MRSA	27	110	100	130	<1.1	<1.1
MRSA	27	120	170	170	140	<0.37
MRSA	98	100	100	81	70	<0.074

注)

MPIPC：オキサシリン
PL-B：ポリミキシンB
AMPH-B：アンホテリシンB

$$\text{発育百分率 (\%)} = \frac{\text{抗生物質含有培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質不含培地で発育した集落数}} \times 100$$

【0046】表5から明らかな通り、各抗生物質の関係濃度の適正值が存在する濃度範囲は、オキサシリン：約0.01—約1.0 μ g 力価/ml、アンホテリシンB：約0.

01—約10 μ g 力価/mlおよびポリミキシンB：約10—約1000 μ g 力価/mlであることが判明した。この結果から、各抗生物質単独の適正濃度範囲が、共存する他の抗

生物質との相乗効果あるいは拮抗効果により大幅に変化することが例証された。すなわち、例えば、ポリミキシンB単独の適正濃度範囲は約25ー約50 μ g 力価/mlであったのに対し、培地中の関係濃度においては、約10ー約1000 μ g 力価/mlと大きく変化する一方、アンホテリシンB単独およびオキサシリン単独の適正濃度範囲、約0.1ー約100 μ g 力価/mlおよび約0.78ー約100 μ g 力価/mlは、本発明の培地中においてはそれぞれ約0.01ー

約10 μ g 力価/mlおよび約0.01ー約1.0 μ g 力価/mlの関係濃度となる。

【0047】実施例5

[MRSA選択培地の選択性と発育支持性] MRSAスクリーン培地とMS培地とMRSA選択培地とをそれぞれ調製した。それらの培地組成を表6に示す。

【0048】

【表6】

MRSA選択培地、MS培地およびMRSAスクリーン培地の組成

MRSA選択培地	MS培地	MRSAスクリーン培地
Bacto-tryptone 10 g Bacto-yeast extract 5 g 塩化ナトリウム 20 g D-マンニトール 10 g フェニルホスフィン 0.06 g アミノホスフィン 1 mg オキサシリン 100 mg オキサシリン 0.1 mg オキサシリン 15 mg オキサシリン 1000 ml pH 7.4	Bacto-tryptone 10 g Bacto-yeast extract 5 g 塩化ナトリウム 30 g D-マンニトール 10 g B C P 0.04 g セフチキシム 25 mg 寒天 15 g 蒸留水 1000 ml pH 7.4	Mueller Hinton 培地 38 g 塩化ナトリウム 40 g オキサシリン 6 mg 蒸留水 1000 ml pH 7.4

【0049】これら3種の培地を使用して、MRSAの選択性と発育支持性を比較検討した。その結果を表7に示した。

【0050】

【表7】

注) B C P : プロムクレゾールブルー

MRSA選択培地、MS培地およびMRSA
スクリーン培地における各種菌株の発育百分率

菌名	菌株番号	発 育 百 分 率 (%)		
		MRSA選択培地	MS 培地	MRSA スクリーン培地
酵 母	36	<0.16	130	160
	37	<0.050	(29) *	(52)
	70	<0.016	210	(150)
	80	<0.015	(52)	(61)
枯草菌	46	<0.0011	126	<0.0011
	53	<0.0025	250	(1.8)
	67	<0.020	71	295
	92	<0.0029	63	<0.0029
緑膿菌	102	<0.000087	(87)	(96)
	103	<0.00011	(63)	(84)
	105	<0.000071	(1)	(140)
	106	<0.000071	(71)	(107)
腸球菌	108	<0.0011	(270)	(230)
	109	(120)	(130)	(87)
	110	(0.029)	(120)	(180)
MRCNS	26	60	90	105
	31	<0.0050	42	105
	35	(2.5)	(53)	141
	44	<0.013	125	100
MSSA	3	<0.00063	<0.00063	(75)
	9	<0.00077	<0.00077	130
	19	<0.00040	<0.00040	(76)
	20	<0.0034	<0.0034	(66)
MRSA	5	52	73	(48)
	27	110	100	240
	87	68	89	89
	98	52	1.7	28

注)

* : 24時間培養では集落が非常に小さくて集落数をカウントすることは不可能であった。

() 内の数値は48時間培養後に計測した値である。

【0051】表7から明らかな通り、MRSA選択培地は酵母、枯草菌、緑膿菌、MSSAの発育を完全に阻止し、腸球菌とMRCNSの一部の菌株の発育を阻止あるいは抑制した。MS培地はMSSAの発育を阻止したが、酵母、枯草菌、緑膿菌、腸球菌、MRCNSの発育は阻止できなかった。MRSAスクリーン培地はMSSAと枯草菌の一部の菌株の発育を阻止あるいは抑制したが、酵母、緑膿菌、腸球菌およびMRCNSの発育は阻止できなかった。

【0052】一方、MRSA48株のすべてはMRSA選択培地で24時間培養後に菌数の減少なく発育したが、MS培地では菌数が100分の1に減少する株が1株あった。MRSAスクリーン培地では、集落の直径が0.5mm未満で肉眼判定が困難なものが3株あった。

【0053】実施例6

[MRSA選択培地におけるポリミキシンBの有用性]
MS培地はセフトゾキシムでMSSAの発育を阻止し、

マンニットとフェノールレッドでMRSA (マンニット分解能陽性)とMRCNS (マンニット分解能陰性)を培地上で鑑別しようとするものである。しかし、MS培地に発育してくるマンニット分解能陽性菌の中にコアグラゼ陰性を示す菌株が臨床材料より分離されることがある。これらの菌株は黄色ブドウ球菌 (マンニット分解能陽性、コアグラゼ陽性)ではなく、マンニット分解能陽性でコアグラゼ陰性のスタフィロкокカス・ヘモリティクス (*Staphylococcus haemolyticus*) やスタフィロкокカス・サブロフィティクス (*Staphylococcus saprophyticus*) の可能性が高い。もし、これらの菌株が *S. haemolyticus*や *S. saprophyticus*であれば、これらはコアグラゼ陰性の表皮ブドウ球菌に属する。そこでマンニット分解能陽性でコアグラゼ陰性を示す85株とMRSA68株のポリミキシンBに対するMICを測定してそれを図1に示した。

【0054】図1より明らかな通り、上記の両菌群間は

で明らかに異なるMIC分布を示した。すなわち、MRSAの97% (66株/68株) はポリミキシンBのMICが $\geq 50 \mu\text{g}$ 力価/mlであり、マンニト分解能陽性でコアグラゼ陰性を示す菌群の98% (83株/85株) はポリミキシンBのMICが $\leq 25 \mu\text{g}$ 力価/mlであった。この結果は、マンニト分解能陽性でコアグラゼ陰性を示す菌群の発育を抑制するために培地中のポリミキシンBが有用であることを示している。

【0055】

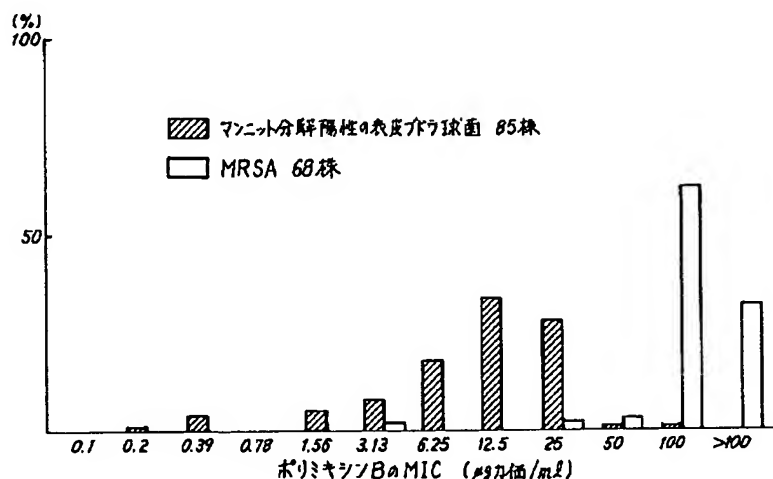
【発明の効果】 上述の構成並びに作用よりなる本発明MRSA選択培地は、MRSAに対して優れた特異的選択性を有するので、種々の菌が混在する臨床および環境材料を接種して、24時間培養後に培地上に発育してきた集

落を観察するだけでMRSAの検出が可能となる。この培地の出現により、従来のように複数の試験を実施する必要がなくなり、検査経費の大幅な削減およびそれに伴う人件費の節減が可能となる。また、検査に要する時間の短縮 (約24時間) は、急を要する感染症の治療や環境汚染対策にとって測り知れないものがあるとともに、本発明培地の使用によりMRSA保菌者の検索や環境中のMRSAサーベイランスが容易となり、医療並びに環境保全対策上に寄与するところが大きい。

【図面の簡単な説明】

【図1】 マンニト分解陽性の表皮ブドウ球菌とMRSAのポリミキシンBに対する感受性分布を示すグラフである。

【図1】



*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]The first antibiotic in which a growth inhibition density range to bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, and methicillin tolerance Staphylococcus epidermidis and a growth support density range to methicillin resistant Staphylococcus aureus overlap mutually, The second antibiotic in which a growth inhibition density range to yeast and a growth support density range to methicillin resistant Staphylococcus aureus overlap mutually, A growth inhibition density range and a growth support density range of methicillin resistant Staphylococcus aureus to bacillus subtilis and methicillin sensitive Staphylococcus aureus the third antibiotic that overlaps mutually, Selection and a differentiation isolation medium of methicillin resistant Staphylococcus aureus which are contained by related potency concentration which supports growth of methicillin resistant Staphylococcus aureus although growth of yeast, bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, methicillin tolerance Staphylococcus epidermidis, and methicillin sensitive Staphylococcus aureus is prevented substantially.

[Claim 2]Said first antibiotic is at least one sort of polypeptide antibiotics chosen from a group which consists of the polymyxin A, B, and C, D, E, and M, Said second antibiotic Amphotericin B, nystatin, pimaricin, Trichomycin, griseofulvin, a pentamycin, can DISHIJIN, They are at least one sort of polyene system antibiotics chosen from a group which consists of Hamai Industries Singh and KUROMIN, The culture medium according to claim 1 which are at least one sort of beta-lactam antibiotics in which said third antibiotic was chosen from a group which consists of oxacillin, methicillin, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin, and nafcillin.

[Claim 3]The culture medium according to claim 2 said whose polypeptide antibiotics are polymyxin B or E, said whose polyene system antibiotic is amphotericin B and in

which said beta-lactam antibiotic is oxacillin.

[Claim 4]said polymixin B or E, amphotericin B, and oxacillin -- respectively -- 10-1000mg potency /l, and 0.01-10mg potency /l -- and -- 0.01 The culture medium according to claim 3 contained by potency concentration of 1.0 mg potency / l.

[Claim 5]The culture medium containing at least 10 g/l of mannite, and 1 to 0.005-g/l Phenol Red according to claim 1, 2, 3, or 4.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application]This invention relates to the isolation medium for dissociating selectively and identifying further the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and the following write it as "MRSA") which is a drug-resistant strain. this invention culture medium is used for an improvement and maintenance of medical science, such as a therapy of an MRSA infection, and prevention, and environmental sanitation.

[0002]

[Description of the Prior Art]Although penicillin showed the curative effect outstanding to the *Staphylococcus aureus* whose chemotherapeutic drugs, such as sulfa drugs, are not effective, the penicillin resistance *Staphylococcus aureus* whose penicillin is not effective increased with the spread of penicillin. although methicillin which will be effective against penicillin resistance *Staphylococcus aureus* in 1960 was developed — use **** — MRSA was discovered soon. After that, *Staphylococcus aureus* acquired tolerance one after another also to the drugs with which the newly developed kinds differ, turned into a drug-resistant strain, and was performed. It will enter in the 1980s, the hospital-acquired infection by MRSA comes (Chemotherapy 31:835-841-1983) to be reported also in our country, and it is rapidly spread in the hospital of the Japan whole country after that, and is spreading in a home for the aged etc. now. The therapy of a drug-resistant MRSA infection may be difficult in many cases, may die, and has come to be taken up as a social problem.

[0003]Conventionally, the check of MRSA was performed through the following procedures. That is, if a specimen is first applied to an isolation medium and it cultivates at 35 ** for 18 to 24 hours, a bacillus will form a colony observable with the naked eye. The inspection of the identification inspection for checking that it is

Staphylococcus aureus about what is considered to be Staphylococcus aureus among the colonies which show various gestalten, i.e., Gram's stain, a coagulase test, a mannite resolution examination, etc., and the susceptibility inspection for checking that it is methicillin tolerance are carried out. Carried out the fishing of the colony for these inspections, and inoculated several kinds of culture media, and also it cultivated at 35 ** for 18 to 24 hours, and also a culture-medium view is observed and it checks that it is MRSA. Therefore, after a specimen is submitted before existence of MRSA was checked, at least 42 to 48 hours was required.

[0004]As a culture medium used for the check inspection of methicillin tolerance, The oxacillin (oxacillin). The MS culture medium (clinical, the microorganism 19:122, and 1992) which added the MRSA screen culture medium (J. Clin.Microbiol.18:1084-1091-1983) and the ceftizoxime (ceftizoxime) which were added is proposed. However, although the growth inhibition effect is seen at some of methicillin sensitive Staphylococcus aureuses (methicillin sensitiveStaphylococcus arureus and the following write it as "MSSA"), and bacillus subtilis, the above-mentioned MRSA screen culture medium, Yeast, Pseudomonas aeruginosa, an enterococcus, and the methicillin tolerance Staphylococcus epidermidis (methicillin resistant coagulase negative Staphylococci and the following) The growth written as "MRCNS" cannot be prevented, and also there is a difficulty of the colony of MRSA which grew up being too small, and causing difficulty to a macro-scopic judging. On the other hand, although an MS culture medium prevents growth of MSSA, growth of yeast, bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, an enterococcus, and MRCNS cannot be prevented, and also there is a problem that the MRSA number of microorganism which grew up may decrease remarkably after 24-hour culture. Thus, when it aims at carrying out isolation culture of MRSA selectively from clinical and environmental material in which various bacilli are intermingled, the culture medium of these existing does not have selectivity and enough differentiation nature.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]Therefore, the purpose of this invention sets it as the 1st purpose to excel in specific selectivity and to provide the easy isolation medium of differentiation to MRSA. The 2nd purpose is by shortening the time which simplifies the examination for MRSA detection and it takes to reduce inspection cost and personnel expenses substantially. The final purpose is to use the therapy and antipollution measure of an MRSA infection as an operation plug that there is [promptly and] no omission.

[0006]

[Means for Solving the Problem] The first antibiotic in which a growth inhibition density range [as opposed to bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, and MRSA in the above-mentioned purpose] and a growth support density range to MRSA overlap mutually, The second antibiotic in which a growth inhibition density range to yeast and a growth support density range to MRSA overlap mutually, Although growth of yeast, bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, MRSA, and MSSA is prevented substantially, the third antibiotic in which bacillus subtilis, and a growth inhibition density range and a growth support density range of MRSA to MSSA overlap mutually, It is attained by selection and a differentiation isolation medium (henceforth an "MRSA selective medium") of MRSA which are contained by related potency concentration which supports growth of MRSA.

[0007] Said first antibiotic is at least one sort of polypeptide antibiotics chosen from a group which consists of the polymyxin A, B, and C, D, E, and M preferably, Preferably said second antibiotic Amphotericin B, nystatin, Rimicidin, trichomycin, griseofulvin, a pentamycin, They are at least one sort of polyene system antibiotics chosen from a group which consists of can DISHIJIN, Hamai Industries Singh, and KUROMIN, Said third antibiotic is at least one sort of beta-lactam antibiotics chosen from a group which consists of oxacillin, methicillin, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin, and nafcillin preferably.

[0008] Especially as said polypeptide antibiotics, polymyxin B or E is preferred, and amphotericin B is preferred especially as said polyene system antibiotic, and oxacillin is preferred especially as said beta-lactam antibiotic.

[0009] said polymyxin B or E, amphotericin B, and oxacillin — respectively — 10–1000mg potency /l, and 0.01–10mg potency /l — and — 0.01 It is desirable especially when containing by potency concentration of 1.0–mg potency / l within the limits attains the purpose of this invention. In polymyxin B or E, about 100 mg potency /l, and amphotericin B are [about 1.0 mg potency /l, and oxacillin of the most desirable related potency concentration] about 0.1 mg potency /l.

[0010] a culture medium concerning this invention — suitable — further — at least — Mannite of 10 g/l and 1 to 0.005–g/l Phenol Red are contained.

[0011] Hereafter, composition of this invention is explained in full detail. As a bacillus whose frequency separated simultaneously with MRSA is high when it aims at carrying out isolation culture of MRSA selectively from clinical and environmental material in which various bacilli are intermingled, Yeast representing the Pseudomonas aeruginosa; true fungi which represent a gram-negative Bacillus about a clinical specimen; there are an enterococcus etc., and there are fungi, bacillus subtilis, etc.,

such as yeast and Mucor, similarly from environmental material, and also MSSA and MRCNS are mentioned. If growth of these typical bacilli can be prevented, it can be considered that a bacillus from a specimen is the taxonomy thing [it, Gram's stain nature, etc.] prevented altogether substantially including a strain which has a close relationship relation in the genetic and ecological feature. Therefore, although an MRSA selective medium of this invention supports growth of MRSA, It contains combining a specific antibiotic two or more maintaining tolerance over MRSA, in order to prevent or control substantially growth of fungi simultaneously mixed by the above-mentioned high frequency so that those susceptibility may be improved on the basis of various kinds of above-mentioned typical strains.

[0012]In this book, saying "growth is prevented substantially." Although reduction of number of microorganism other than preventing growth thoroughly by the toxicity, or destroying is accepted clearly, it shall mean preventing growth of a bacillus, including a case where slight growth is accepted near the limit of measurement, as tolerance level, to such an extent that it does not interfere with purpose achievement of this invention.

[0013]In this invention, a minimum inhibitory concentration (henceforth "Media Interface Connector") by an agar dilution method according to a Japanese Society of Chemotherapy standard method is applied as a rule of thumb of the tolerance of a bacillus, and susceptibility to a culture medium and an antibiotic blended. What has a comparatively small value of Media Interface Connector to a certain bacillus has the high susceptibility of a bacillus, and what has a comparatively large value of Media Interface Connector on the contrary is strengthened by tolerance.

[0014]As the first antibiotic blended with this invention selective medium, There are polypeptide antibiotics belonging to a polymyxin (polymyxin) group, For example, the polymyxin A, polymixin B, the polymyxin C, the polymyxin D, polymyxin E (colistin colistin), and the polymyxin M are mentioned, and polymixin B and polymyxin E (colistin) are applied especially advantageously. These are independent, or unless it is generated very much in a degree, they can blend antagonistic inhibition of activity combining plurality.

[0015]Although bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, and MRCNS show high susceptibility to the first antibiotic of the above, MRSA shows strong tolerance. In the case of polymixin B and colistin, to bacillus subtilis For example, below about 25-mg potency / l. It is abbreviation to Pseudomonas aeruginosa. While the comparatively low Media Interface Connector about 25-mg potency / l is shown to MRCNS as for below 0.78-mg potency / l, Media Interface Connector to MRSA is as high as about 50

mg/l. A density range, i.e., a "growth inhibition density range" of at least about 25-mg potency / l, where this prevents all the growth of bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, and MRCNS. It means that a density range which supports growth of MRSA, i.e., a "growth support density range" of at most about 50-mg potency / l, overlaps between about 25-mg potency / l, and about 50-mg potency / l. Therefore, it is antibiotic independent [this] theoretically, and in concentration between about 25-mg potency / l, and about 50-mg potency / l, growth of MRSA will be permitted at the same time it prevents all the growth of bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, and MRCNS. If aimed only at Pseudomonas aeruginosa, growth of Pseudomonas aeruginosa can be prevented supporting growth of MRSA by concentration of about 0.78-mg potency / l.

[0016]As the second antibiotic applicable to this invention, For example, amphotericin B (amphotericin B), nystatin (nystatin), Pimaricin (pimaricin), the trichomycin (trichomycin), Griseofulvin (griseofulvin), the pentamycin (pentamycin), Can DISHIJIN (candididine), Hamai Industries Singh (hamycin), Polyene system antibiotics, such as KUROMIN; The miconazole (miconazole), Ketoconazole (ketoconazole), the econazole (econazole), Azole antibiotics, such as clotrimazole (clotrimazole) and the fluconazole (fluconazole); Glutar imide system antibiotic [, such as Actidione (actidione),]; and flucytosine (flucytosine)5-FC, Pyrrole nit phosphorus (pyrrolnitrin), the siccanin (siccanin), the SARAMAI cetin (saramycetin), etc. are mentioned. Among these, especially a polyene system antibiotic is preferred and amphotericin B most preferably. These are independent, or unless it is generated very much in a degree, they can blend antagonistic inhibition of activity combining plurality.

[0017]A growth inhibition density range [as opposed to yeast in the second antibiotic of the above] and a growth support density range to MRSA overlap greatly mutually. for example, — receiving yeast, if it sees about the most typical amphotericin B — at most — abbreviation Media Interface Connector [as opposed to / while the remarkable low Media Interface Connector 0.1 mg potency /l is shown / MRSA] — abbreviation More than 100-mg potency / l, and a high value are shown. A density range, i.e., a "growth inhibition density range" abbreviation 0.1mg potency / more than l, where this prevents growth of yeast. a density range which supports growth of MRSA — namely, — a "growth support density range" below 100-mg potency / l — abbreviation 0.1-mg potency / l, and abbreviation It means overlapping between 100-mg potency / l (above). Therefore, it is antibiotic independent [this] theoretically and abbreviation. 0.1-mg potency / l, and abbreviation In concentration between 100-mg potency / l, growth of MRSA will be permitted at the same time it

prevents growth of yeast thoroughly.

[0018]As the third antibiotic applicable to this invention, beta-lactam system, for example, oxacillin, methicillin, the cloxacillin (cloxacillin), Dicloxacillin (dicloxacillin), the flucloxacillin (flucloxacillin), Penicillin antibiotics, such as the nafcillin (nafcillin); Cefaloridine (cephaloridine), Cephalothin (cephalothin), the cefazolin (cefazolin), Cephapirin (cephapirin), the cefacetrile (cephacetrile), Ceftezole (ceftezole), the cefaloglycin (cephaloglycin), Cefalexin (cephalexin), cefradine (cefradine), Cefatrizine (cefatrizine), the cefaclor (cefaclor), SEFUROKUSAJIN (cefroxadine), cefadroxil (cefadroxil), cefprozil (cefprozil), cefamandole (cefamandole), cefotiam (cefotam), the cefuroxime (cefuroxime), Cefuroxime AKUSECHIRU (cefuroxime axetil), Cefotiam HEKISECHIRU (cefotiam hexetil), the cefoperazone (cefoperazone), Cefotaxime (cefotaxime), the ceftizoxime (ceftizoxime), and, [cefmenoxime] [SEFUPI Lamaism ide] SEFUTAJI dime (ceftazidime), the ceftriaxone (ceftriaxone), Cefpimizole (cefpimizole), SEFUZONAMU (cefuzonam), SEFODIJIMU (cefodizime), the SEFUPI loam (cefprome), Cefepime (cefepime), SEFUKU lysine (cefclidin), Cefsulodin (cefsulodin), the cefixime (cefixime), Ceftributen (ceftributen), SEFUJINIRU (cefdinir), Cefpodoxime proxetil (cefpodoxime proxetil), cefteteram pivoxil (cefteteram pivoxil), SEFETAMETOPIBOKISHIRU (cefetamet pivoxil), SEFUKAMETOPIBOKISHIRU (cefcamate pivoxil), Cephem antibiotics, such as ME-207; The cefoxitin (cefoxitin), Cefmetazole (cefmetaole), the cefotetan (cefotetan), Cefbuperazone (cefbuperazone), SEFUMINOKUSU (cefminox), Which cephamycin system antibiotic; The latamoxef (latamoxef), Oxa cephem antibiotic; and imipenem (imipenem), such as the flomoxef (flomoxef), Carbapenem antibiotics, such as PANIPENEMU (panipenem) and the meropenem (meropenem), can be mentioned, penicillins is preferred and oxacillin is [among these] especially the most preferred. These are independent, or unless it is generated very much in a degree, they can blend antagonistic inhibition of activity combining plurality.

[0019]A growth inhibition density range [as opposed to bacillus subtilis and MSSA in the third antibiotic of the above] and a growth support density range to MRSA overlap greatly mutually. For example, when it sees about the most typical oxacillin, it is abbreviation to below about 0.78-mg potency / l, and MSSA to bacillus subtilis. Media Interface Connector [as opposed to / while the remarkable low Media Interface Connector below 0.4 mg potency / l is shown / MRSA] is abbreviation. More than 100-mg potency / l, and a high value are shown. A density range, i.e., a "growth inhibition density range" abbreviation 0.78mg potency / more than l, where this [both] prevents growth with bacillus subtilis and MSSA. a density range which

supports growth of MRSA — namely, — It means that a “growth support density range” below 100-mg potency / l overlaps between about 0.78-mg potency / l, and about 100-mg potency / l (above). Therefore, it is antibiotic independent [this] theoretically and they are about 0.78-mg potency / l, and abbreviation. In concentration between 100-mg potency / l, growth of MRSA will be permitted at the same time it prevents growth of bacillus subtilis and MSSA thoroughly.

[0020]Any of microorganism metabolite, synthetic material, and a semisynthesis substance may be sufficient as an antibiotic applied to this invention. A value of Media Interface Connector to each strain of these antibiotics, Since it is aimed at the living body activity of a microorganism, naturally it changes also between strains of a thing belonging to a relative antibiotic group of the above, for example, the first group, and also proper loadings of these three sorts of antibiotics cannot be uniquely defined by synergy of activity between each antibiotic, or antagonistic inhibition operation. Therefore, although a culture medium blended on the basis of Media Interface Connector to a typical bacillus of each antibiotic prevents substantially growth of yeast, bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, MRCNS, and MSSA, those loadings, Related potency concentration which supports growth of methicillin resistant Staphylococcus aureus is determined suitably experimentally.

[0021]For example, said polypeptide antibiotics are polymixin B or E, In the most desirable mode of this invention said whose polyene system antibiotic is amphotericin B and in which said beta-lactam antibiotic is oxacillin, taking synergy of activity, and an antagonistic inhibition operation into consideration — respectively — about — about [10-about 1000 mg potency /l, and] — about [0.01-about 10 mg potency /l, and] — if it blends by potency concentration of 0.01-about 1.0-mg potency / l — a good result — **** — things were checked experimentally.

[0022]The above-mentioned antibiotic is blended into a solid medium which is usually used commonly and containing agar, gelatin, etc. The culture medium can apply both a natural medium a semisynthetic medium and a synthetic medium, generally, in addition to fundamental mineral constituents, such as Na, K, Ca, Mg, P, and Cl, makes a fundamental component what added suitably a carbon source, a source of Chisso, amino acid, a vitamin, hormone, etc., and is abbreviation about pH. It adjusts to 7.4. In order that an MRSA selective medium of this invention may judge other bacilli and MRSA which have grown to this culture medium, even if still less It is preferred to contain mannite of 10 g/l and 1 to 0.005-g/l Phenol Red (pH indicator). Although it is usable also in other pH indicators, bromthymol blue (BTB) prevents growth of Staphylococcus, and since there is a possibility of influencing an operation of a culture

medium, it should avoid it, for example. What preparation of a culture medium should be performed for under a sterile condition cannot be overemphasized.

[0023]

[Function]Subsequently, an operation of this invention MRSA selective medium is described. this invention MRSA selective medium which becomes the above-mentioned composition is exposed to *****-ed, or clinical or the specimen from environment is applied to a culture medium, and standing culture is carried out at about 30 to 35 ** for 18 to 24 hours. this invention culture medium checks substantially growth of the saprophytic bacteria represented by yeast, bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, MSSA, and MRCNS, and forms the characteristic colony which MRSA was made to grow selectively and the circumference colored yellow. This coloring is based on addition of mannite and Phenol Red. That is, Phenol Red discolors for the acid generated by the mannite disintegration of MRSA which is a mannite resolution positivity, and discernment of MRSA is made easy.

[0024]under the present circumstances, the enterococcus of a mannite resolution positivity and exceptionally slight bacillus subtilis may grow. However, since the colony of these bacilli shows the gestalt from which the colony of MRSA differs, the differentiation on a culture medium is easy. Since hydrogen peroxide will carry out decomposition foaming by operation of the catalase to contain in the case of MRSA if a colony is lightly stabbed by the glass capillary which carries out occlusion of the hydrogen peroxide of concentration about 3%, it is also easily discriminable from an enterococcus etc. by observing it.

[0025]

[Example]Hereafter, an example explains this invention with reference to drawings further again.

four shares and an enterococcus were prepared for the yeast separated from an example 1 use strain clinical and environmental material, bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, MSSA, and MRCNS, and 85 shares of staphylococci of coagulase negativity were prepared for three shares and MRSA with 68 shares and a mannite decomposition positivity, respectively. [0026]As for Fujisawa Industries, oxacillin, and colistin, in use antibiotic ceftizoxime, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd. and polymixin B received offer of the powder authorized [potency] from FUJI PHARMACEUTICAL CO., LTD. Amphotericin B purchased the amphotericin B for injection, carried out weighing of the contents in 1 vial, and used them in quest of the potency per mg.

[0027][Preparation of a culture medium] Weighing of agar, peptone, etc. other than an

antibiotic is carried out, it melts in purified water, and autoclave sterilization is carried out for 20 minutes by 121 **. The antibiotic was added to the culture medium kept at 50-60 ** after sterilization, 20 ml was poured distributively to each Petri dish, and it was considered as the solid medium.

[0028][An identification test and drug sensitivity examination] Culture pure of the colony obtained by the first isolation culture was carried out to the nutrient agar medium, and the identification test and the drug sensitivity examination were carried out from the colony obtained by culture pure. the bacillus in which the character of the micrococcus of a mannite resolution positivity and a Gram's stain positivity, a catalase positivity, and a coagulase positivity is shown was used as *Staphylococcus aureus*. The drug sensitivity examination measured Media Interface Connector with the agar dilution method according to a Japanese Society of Chemotherapy standard method. Media Interface Connector of ceftizoxime and oxacillin set the yellow BUTOU micrococcus of ≥ 100 mug potency / ml, and ≥ 6.25 microg potency / ml to MRSA, respectively.

[0029][The selectivity of the culture medium by the Miles & Misra method and growth bearing-properties examination] Each strain with nutrient broth 35 **, cultivating for 18 hours — these fungus liquid — sterilization physiological saline 10 times, 10^2 twice, 10^3 twice, 10^4 twice, 10^5 twice, and 10^6 twice, [dilute and] The culture medium which contains an antibiotic for every [of each dilution fungus liquid / 5micro / l], and the same plate agar that does not contain an antibiotic were inoculated, respectively, and it applied and extended with the KONRAJI stick. After cultivating at 35 ** for 24 hours, the number of colonies which grew was counted and it asked for growth percentage from the following formula.

[Equation 1]

$$\text{発育百分率 (\%)} = \frac{\text{抗生物質を含む培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質を含まない培地で発育した集落数}} \times 100$$

In order to observe the growth bearing properties of a culture medium, the diameter of the independent colony was measured under the microscope using a micrometer.

[0030][Media Interface Connector to the various antibiotics of the strain separated from clinical and environmental material] Yeast which is a bacillus with high frequency separated from clinical and environmental material in which various bacilli are intermingled simultaneously with MRSA, In order to prevent growth of fungi, such as *Mucor*, *bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, an enterococcus, etc., Media Interface Connector to these bacilli was measured first. The result was shown in

Table 1.

[0031]

[Table 1]

臨床および環境材料より分離される菌種に対する各種抗生物質のMIC

菌名	菌株番号	MIC (μg 力価/ml)				
		MIPIC	PL-B	CL	AMPH-B	CZX
酵母	36	>100	25	25	≤0.1	>100
	37	>100	25	100	≤0.1	>100
	70	>100	25	25	≤0.1	>100
	80	>100	12.5	6.25	≤0.1	>100
枯草菌	92	0.39	25	25	>100	>100
	46	0.78	12.5	25	>100	>100
	53	0.78	12.5	25	>100	>100
	67	6.25	0.78	1.56	>100	>100
緑膿菌	102	>100	0.78	0.78	>100	25
	103	>100	0.78	0.78	>100	12.5
	105	>100	0.78	0.78	>100	>100
	106	>100	0.39	0.78	>100	100
	107	>100	0.78	0.78	>100	50
腸球菌	108	12.5	>100	>100	>100	>100
	109	>100	50	100	>100	>100
	110	12.5	50	100	100	>100
MRCNS	31	6.25	6.25	12.5	>100	>100
	38	12.5	6.25	12.5	>100	>100
	26	>100	12.5	25	>100	>100
MSSA	3	0.2	100	ND	ND	0.78
	9	0.2	50	ND	ND	3.13
	18	0.39	50	ND	ND	6.25
	20	0.2	100	ND	ND	3.13
MRSA	27	>100	50	100	>100	>100
	28	>100	50	100	>100	>100
	29	>100	50	>100	>100	>100

注)

MIPIC : オキサシリン

PL-B : ポリミキシンB

CL : コリスチン

AMPH-B : アンホテリシンB

CZX : セフトゾキシム

[0032] In the passage clear from Table 1, bacteria showed the tolerance of >100 mug potency / ml to four shares of yeast having shown the high susceptibility of ≤0.1 mug potency / ml to amphotericin B. Five shares of *Pseudomonas aeruginosa* to polymixin B. Media Interface Connector of 0.39-0.78microg potency / ml was shown, and it was

checked that growth inhibition of yeast, bacillus subtilis, and Pseudomonas aeruginosa can be performed with these antibiotics.

[0033]The comparative example 1 [examination of ceftizoxime concentration] ceftizoxime is an antibiotic of the same beta-lactam system as methicillin, It is known that cross resistance is shown also in the beta-lactam antibiotic with which chemical structure other than methicillin is similar (clinical pathology, 39:548- 556-1991), and MRSA has added ceftizoxime to selection of MRSA in the MS culture medium. In spite of being genetically [in MRSA] the same, it is known that the cell from which a tolerant manifestation differs is among cell populations, and such a strain is called hetero tolerance. then, the culture medium which carried out 25microg potency / ml addition of 1microg potency / ml, and the polymixin B for amphotericin B — ceftizoxime — 3.13 and 6.25 — 12.5 or 25microg /ml addition being carried out, and, The ceftizoxime concentration which can classify MSSA and MRSA using the strain of hetero tolerance was examined. The result was shown in Table 2.

[0034]

[Table 2]

セフチゾキシム濃度の検討

菌	菌株 番号	I 発育 百 分 率 (%)						
		MH培地+4% NaCl への抗生物質配合量 (μ g 力価/ml)		基礎培地+ AMPH-B + PL-B + (1 μ g 力価/ml) (25 μ g 力価/ml)				
				CZX配合量 (μ g 力価/ml)				
		CZX : 25	NP1PC : 6	0	3.13	6.25	12.5	25
MRSA	5	138	88	94	76	71	49	20
	27	140	100	79	58	63	68	53
	87	58	29	100	<0.083	<0.083	0.25	0.75
	98	0.042	3.2	140	<0.23	<0.23	<0.23	<0.23
MSSA	3	ND	ND	117	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17
	9	ND	ND	48	<0.21	<0.21	<0.21	<0.21
	19	ND	ND	121	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14
	20	ND	ND	107	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14

注)

MH培地 : Mueller Hinton培地

NPIPC : オキサシリン

PL-B : ポリミキシンB

AMPB-B : アンホテリシンB

CZX : セフチゾキシム

$$\text{発育百分率 (I)} = \frac{\text{抗生物質含有培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質不含培地で発育した集落数}} \times 100$$

[0035]Although growth was not accepted [passage clear from Table 2] in the culture medium of a gap to carry out 3.13 – 6.25microg potency / ml addition in ceftizoxime as

for the stock of the strain number 87 of MRSA, growth was accepted in the 12.5microg potency / ml whose concentration is higher than it, and 25microg potency / ml addition culture medium. This is a skip phenomenon often observed by ceftizoxime. Therefore, it became clear that it was not suitable to add ceftizoxime to a culture medium for the purpose of detection of such a strain.

[0036]When 25microg potency / ml addition of 1microg potency / ml, and the polymixin B were carried out for amphotericin B at the culture medium as for which 6microg potency / ml contains 25microg potency / ml, or oxacillin for Example 2 [examination of stability of oxacillin] ceftizoxime, growth control of MRSA was observed by the synergistic effect. The result was shown in Table 3.

[0037]

[Table 3]

各種抗生物質がMRSAの発育に及ぼす影響

基礎培地への抗生物質配合量 (μ g 力価/ml)	発育百分率 (%)	
	MRSA 87	MRSA 98
CZX : 25	1.6	0.013
CZX : 25 + AMPH-B : 1	1.3	<0.00022
CZX : 25 + PL-B : 25	0.083	<0.00022
CZX : 25 + AMPH-B : 1 + PL-B : 25	0.0017	<0.00022
MPIPC : 6	13	1.1
MPIPC : 6 + AMPH-B : 1	22	0.80
MPIPC : 6 + PL-B : 25	70	0.40
MPIPC : 6 + AMPH-B : 1 + PL-B : 25	5.7	0.11

注)

MPIPC : オキサシリン
PL-B : ポリミキシン B
AMPH-B : アンホテリシン B
CZX : セフトゾキシム

$$\text{発育百分率 (\%)} = \frac{\text{抗生物質含有培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質不含培地で発育した集落数}} \times 100$$

[0038]The oxacillin of the aforementioned synergistic effect was [passage clearer than Table 3] an order of about 1/1000 of ceftizoxime. Thus, the high stability of oxacillin was checked.

[0039]25, 50,100, 200, and the culture medium that carried out 400microg potency / ml addition were prepared for polymixin B to the culture medium which carries out 1microg potency / ml content of the Example 3 [examination of concentration of polymixin B and oxacillin] amphotericin B, and growth of bacillus subtilis, MRSA, and

MRCNS was observed. As a result, polymixin B Influence was not looked at by growth of MRSA although growth of bacillus subtilis and MRCNS was controlled in the culture medium which carried out 100microg potency / ml addition.

[0040]Then, they are 1microg potency / ml, and polymixin B about amphotericin B. It is oxacillin to the culture medium which carries out 100microg potency / ml content. 0.1, 0.2, and the culture medium that carried out 0.39-0.78microg potency / ml addition were prepared, and bacillus subtilis, MSSA, and MRSA growth were observed. The result was shown in Table 4.

[0041]

[Table 4]

オキサシリン濃度の検討

菌	菌株番号	発育百分率 (%)				
		AMPB-B(1 μ g 力価/ml)+PL-B(100 μ g 力価/ml) +				
		MPIPCの配合量(μ g力価/ml)				
		0	0.1	0.2	0.39	0.78
枯草菌	46	<0.0017	<0.0017	<0.0017	<0.0017	<0.0017
MSSA	3	97	<0.00026	<0.00026	<0.00026	<0.00026
MRSA	87	97	130	120	140	7.1
	98	150	130	25	1.5	<0.0005

注)

MPIPC : オキサシリン

PL-B : ポリミキシンB

AMPB-B : アンホテリシンB

CZX : セフトゾキシム

$$\text{発育百分率 (\%)} = \frac{\text{抗生物質含有培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質不含培地で発育した集落数}} \times 100$$

[0042]A passage clear from Table 4 is oxacillin. In the culture medium which more than 0.2microg potency / ml added, growth control of the MRSA strain number 98 was observed. However, growth control of MRSA was not observed in the culture medium which carried out 0.1microg potency / ml addition of the oxacillin, but growth of MSSA and bacillus subtilis was prevented.

[0043]From the above result, an example with a preferred presentation of an MRSA selective medium was defined as follows. The amphotericin B which is an antifungal in order to prevent growth of yeast-like fungi or Mucor 1microg potency / ml, It is polymixin B in order to prevent growth of gram-negative-bacteria nature Bacilli including Pseudomonas aeruginosa, and the Staphylococcus epidermidis. It is oxacillin in order to prevent 100microg potency / ml, and MSSA. 0.1microg potency / ml addition is carried out. In order to make easy differentiation with other bacilli and

MRSA which have grown to this invention culture medium, mannite and Phenol Red are added.

[0044]Example 4 [examination of related concentration of each antibiotic] amphotericin B. 1microg potency / ml, and polymixin B. To the culture medium which carries out 100microg potency / ml content, oxacillin. 0.10, 0.1, 1.0, and 10 — or — . Five kinds of culture media which carried out 100microg potency / ml combination; polymixin B. 100microg potency / ml, and oxacillin. To the culture medium which carries out 0.1microg potency / ml content, amphotericin B. 0.10, 0.1, 1.0, and 10 — or — . They are 1microg potency / ml, and oxacillin about five kinds of culture-medium; and amphotericin B which carried out 100microg potency / ml combination. Polymixin B to the culture medium which carries out 0.1microg potency / ml content 0.1, 1.0, 10, 100, or five kinds of culture media that carried out 1000microg potency / ml combination. It prepared and the growth after the 24-hour culture on these culture media of *Pseudomonas aeruginosa*, MSSA, MRCNS, and MRSA was observed. The result was shown in Table 5.

[0045]

[Table 5]

抗生物質の関係濃度の検討

菌	菌株 番号	発 育 百 分 率 (%)				
		AMPH-B(1 μ g 力価/ml)+PL-B(100 μ g 力価/ml) +				
		MPIPC の配合量 (μ g 力価/ml)				
		0.01	0.1	1.0	10	100
MSSA	3	140	<0.26	<0.26	<0.26	<0.26
MRSA	27	53	92	81	19	<0.28
MRSA	98	150	120	<0.13	<0.13	<0.13
MRSA	27 98	PL-B(100 μ g 力価/ml)+MPIPC(0.1 μ g 力価/ml) +				
		AMPH-B の配合量 (μ g 力価/ml)				
		0.01	0.1	1.0	10	100
		89	78	53	92	<0.28
MRSA	98	110	100	100	<0.14	<0.14
緑膿菌	102 35 27 98	AMPH-B(1 μ g 力価/ml)+MPIPC(0.1 μ g 力価/ml) +				
		PL-B の配合量 (μ g 力価/ml)				
		0.01	0.1	1.0	10	100
		121	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14
MRCNS	35	110	100	130	<1.1	<1.1
MRSA	27	120	170	170	140	<0.37
MRSA	98	100	100	81	70	<0.074

注)

MPIPC: オキサシリン

PL-B: ポリミキシンB

AMPH-B: アンホテリシンB

$$\text{発育百分率 (\%)} = \frac{\text{抗生物質含有培地で発育した集落数}}{\text{抗生物質不含培地で発育した集落数}} \times 100$$

[0046]A passage clear from Table 5 the density range where the appropriate value of the related concentration of each antibiotic exists, oxacillin: — About 0.01 — about — 1.0 mug potency / ml, and amphotericin B: — about — 0.01—about 10microg potency / ml, and polymixin B: — about — it became clear that they were 10—about 1000microg potency / ml. It was illustrated that a proper density range antibiotic independent [each] changes with the synergistic effects or the antagonism effects with an antibiotic of the others which live together from this result substantially.

Namely, in the related concentration in a culture medium to, for example, polymixin B independent proper density ranges having been abbreviation 25—about 50microg potency / ml, While changing a lot with abbreviation 10—about 1000microg potency / ml, an amphotericin B independent and oxacillin independent proper density range, abbreviation 0.1—abbreviation about [100microg potency / ml, and] — 0.78—abbreviation setting 100microg potency / ml in the culture medium of this invention — respectively — about — about [0.01—about 10microg potency / ml, and] — 0.01—abbreviation It becomes the related concentration of 1.0microg potency / ml. [0047]The selectivity of an MRSA selective medium, the example 5 [growth bearing-properties] MRSA screen culture medium, the MS culture medium, and the MRSA selective medium were prepared, respectively. Those medium compositions are shown in Table 6.

[0048]

[Table 6]

MRSA 選択培地、MS 培地および MRSA スクリーン培地の組成

MRSA 選択培地	MS 培地	MRSA スクリーン培地
Bacto-tryptone 10 g Bacto-yeast extract 5 g 塩化ナトリウム 20 g D-マンニトール 10 g フェニルレシニン 0.06 g アミノホキシリン 1 mg ポリキサリシン 100 mg オキサシリン 0.1 mg 寒天 15 g 蒸留水 1000 ml pH 7.4	Bacto-tryptone 10 g Bacto-yeast extract 5 g 塩化ナトリウム 30 g D-マンニトール 10 g BCP 0.04 g セフチゾキシム 25 mg 寒天 15 g 蒸留水 1000 ml pH 7.4	Mueller Hinton 培地 38 g 塩化ナトリウム 40 g オキサシリン 6 mg 蒸留水 1000 ml pH 7.4

注) BCP : ブロムクレゾールパーブルー

[0049] These three sorts of culture media were used, and the comparative examination of the selectivity and growth bearing properties of MRSA was carried out. The result was shown in Table 7.

[0050]

[Table 7]

MRSA選択培地、MS培地およびMRSA
スクリーン培地における各種菌株の発育百分率

菌名	菌株番号	発 育 百 分 率 (%)		
		MRSA選択培地	MS 培地	MRSA スクリーン培地
酵 母	36	<0.16	130	160
	37	<0.050	(29) *	(52)
	70	<0.016	210	(150)
	80	<0.015	(52)	(61)
枯草菌	46	<0.0011	126	<0.0011
	53	<0.0025	250	(1.8)
	67	<0.020	71	295
	92	<0.0029	63	<0.0029
緑膿菌	102	<0.000087	(87)	(96)
	103	<0.00011	(63)	(84)
	105	<0.000071	(1)	(140)
	106	<0.000071	(71)	(107)
腸球菌	108	<0.0011	(270)	(230)
	109	(120)	(130)	(87)
	110	(0.029)	(120)	(180)
MRCNS	26	60	90	105
	31	<0.0050	42	105
	35	(2.5)	(53)	141
	44	<0.013	125	100
MSSA	3	<0.00063	<0.00063	(75)
	9	<0.00077	<0.00077	130
	19	<0.00040	<0.00040	(76)
	20	<0.0034	<0.0034	(66)
MRSA	5	52	73	(48)
	27	110	100	240
	87	68	89	89
	98	52	1.7	28

注)

* : 24時間培養では集落が非常に小さくて集落数をカウントすることは不可能であった。
() 内の数値は48時間培養後に計測した値である。

[0051]The MRSA selective medium prevented thoroughly growth of yeast, bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, and MSSA, and the passage clear from Table 7 prevented or controlled growth of some strains of an enterococcus and MRCNS. Although the MS culture medium prevented growth of MSSA, growth of yeast, bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, an enterococcus, and MRCNS was not able to be prevented. Although the MRSA screen culture medium prevented or controlled growth

of some strains of MSSA and bacillus subtilis, growth of yeast, Pseudomonas aeruginosa, an enterococcus, and MRCNS was not able to be prevented.

[0052]On the other hand, although 48 shares of all MRSA grew without reduction in number of microorganism after 24-hour culture by the MRSA selective medium, number of microorganism in an MS culture medium. There was one share of stock which decreases in number to 1/100. The diameter of a colony in an MRSA screen culture medium. There were three things which have a difficult macro-scopie judging at less than 0.5 mm.

[0053]Example 6 [usefulness of polymixin B in MRSA selective medium] MS culture medium tends to prevent growth of MSSA by ceftizoxime, and tends to judge MRSA (mannite resolution positivity) and MRCNS (mannite resolution negativity) on a culture medium by mannite and Phenol Red. However, the strain in which coagulase negativity is shown may be separated from a clinical specimen into the mannite resolution positive bacteria which grow to an MS culture medium. these strains — Staphylococcus aureus (a mannite resolution positivity, a coagulase positivity) — not but, the possibility of Staphylococcus HEMORITIKUSU (Staphylococcus haemolyticus) of a mannite resolution positivity and coagulase negativity or Staphylococcus SAPUROFITIKUSU (Staphylococcus saprophyticus) is high. if these strains are S.haemolyticus and S.saprophyticus, these belong to the Staphylococcus epidermidis of coagulase negativity. Then, Media Interface Connector to the polymixin B of 85 shares and 68 shares of MRSA which shows coagulase negativity with a mannite resolution positivity was measured, and it was shown in drawing 1.

[0054]As for the passage clearer than drawing 1, Media Interface Connector distribution which comes out and is clearly different was shown between both the above-mentioned microbial groups. That is, Media Interface Connectors of polymixin B of 98% of the microbial groups (83 shares/(85 shares)) which Media Interface Connectors of polymixin B are ≥ 50 microg potency / ml, and 97% of MRSA (66 shares/(68 shares)) shows coagulase negativity with a mannite resolution positivity were ≤ 25 microg potency / ml. This result shows that the polymixin B in a culture medium is useful, in order to control growth of the microbial group in which coagulase negativity is shown with a mannite resolution positivity.

[0055]

[Effect of the Invention]Since this invention MRSA selective medium which consists of above-mentioned composition and operation has the specific selectivity outstanding to MRSA, it becomes detectable [MRSA] only by inoculating clinical and environmental material in which various bacilli are intermingled, and observing the

colony which has grown on a culture medium after 24-hour culture. It becomes unnecessary to carry out two or more examinations like before with the advent of this culture medium, and becomes reducible [the personnel expenses accompanying large reduction and it of inspection cost]. Shortening (about 24 hours) of the time which an inspection takes, While there is what is unfathomable for the therapy and antipollution measure of an infectious disease urgent, the MRSA surveillance in an MRSA germ carrier's search or environment becomes easy by use of this invention culture medium, and it largely contributes on medical science and environmental preservation measures.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]it is a graph which shows the susceptibility distribution over the epidermis BUTOU micrococcus of a mannite decomposition positivity, and the polymixin B of MRSA.